



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COORDENAÇÃO DE PESQUISA

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA – PICVOL

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO RS854560 (GENE PON1) EM
TRABALHADORES RURAIS**

Área do conhecimento: Genética humana

Subárea do conhecimento: Análise toxicológica

Especialidade do conhecimento: Investigação da saúde do trabalhador

Relatório Final

08/2017 a 07/2018

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica
PICVOL

Autora: Samantha Raissa Silva Duarte

Orientadora: Claudia Cristina Kaiser Pinto

RESUMO

Diversos fatores interferem no mecanismo de intoxicação por Organofosforados (OFs). Dentre eles, fatores externos, como grau e tempo de exposição e uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's), e também fatores internos, determinados pela genética. Nesse contexto, certos polimorfismos poderiam modular a resposta do indivíduo perante uma intoxicação. **Objetivo:** Analisar o polimorfismo genético rs854560 (gene PON1) em trabalhadores rurais dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim-SE. **Metodologia:** A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência do SNP foi o PCR em tempo real. Para teste de associação das variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. Para os testes dos modelos genéticos a Regressão Logística Binária foi utilizada no Modelo Aditivo e o Teste Exato de Fisher e teste Qui-Quadrado nos Modelos Dominante e Recessivo ($p < 0,05$). **Resultados:** Foram genotipados 413 trabalhadores rurais. O polimorfismo no gene da PON1 (rs854560) apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi encontrado como alelo mais frequente o alelo A, sendo que os resultados mostraram maior frequência de indivíduos portadores do alelo selvagem em homozigose (47,7%), seguido do genótipo heterozigoto (41,6%). **Conclusão:** Este polimorfismo é uma variante que merece mais estudos, assim como outros SNPs que podem estar envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: Polimorfismos genéticos, PON1, Trabalhadores rurais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS.....	7
3. METODOLOGIA	7
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	8
5. CONCLUSÕES.....	12
6. PERSPECTIVAS	12
7. OUTRAS ATIVIDADES	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

1. INTRODUÇÃO

Além dos fatores extrínsecos que podem trazer prejuízos à população exposta aos organofosforados (OF), tais como grau e tempo de exposição, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e hábitos e comportamentos adequados dos trabalhadores agrícolas, temos que fatores intrínsecos também podem estar interferindo no mecanismo das intoxicações, como por exemplo a variabilidade genética que a população apresenta. A presença de genótipos polimórficos pode ser um fator determinante para a apresentação de sintomas característicos; estes podem tornar o indivíduo mais ou menos susceptível para as possíveis reações pós-exposição (GÓMEZ-MARTÍN *et al.*, 2015; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

As enzimas envolvidas no processo de hidrólise dos OFs são proteínas produzidas através da tradução do RNA, que recebe a informação do DNA presente no núcleo para proceder a síntese protéica (SHENHAR-TSARFATY *et al.*, 2013). Levando-se em conta o alto grau de variabilidade genética que a população em geral possui e que se manifesta nas diferentes características fenotípicas apresentadas, temos que a genética se apresenta como fator determinante para os indivíduos.

As alterações genéticas, que são mudanças na sequência referência do DNA, apresentam-se em duas classes, divididas pela frequência em que ocorrem na população e pelo grau de acometimento da saúde dos indivíduos que as apresentam.

Dentre os mecanismos de polimorfismos que se manifestam no ser humano, destacamos os Polimorfismos de Nucleotídeo Único, os SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism), caracterizado pelo DECS (Descritores em Ciências da Saúde) como uma “variação nucleotídica única em sequência genética, que ocorre com frequência apreciável na população”. Ou seja, é uma

alteração de apenas um nucleotídeo, de determinado códon, que vai interferir na quantidade de proteína produzida ou na sua eficácia funcional.

A variabilidade genética individual tem impacto na resposta do organismo à exposição/absorção, bem como na regulação da resposta e metabolização e tempo de atuação da substância. A toxicogenômica é a área de pesquisa que toma por base o tempo de efeito das drogas sobre a expressão do gene e é capaz de prever efeitos tóxicos mais cedo do que as tecnologias tradicionais, analisando as alterações nos biomarcadores do genoma que precedem os danos histológicos em órgãos.

Alguns dos genes marcadores são específicos para determinados órgãos e alguns deles são indicadores gerais de toxicidade em múltiplos órgãos (FABIAN, *et al.*, 2011). Além disso, o conhecimento humano de vias metabólicas poderá fornecer informações que auxiliam no processo de avaliação de riscos (ROSE, *et al.*, 2005). Os genes alvo desta área se baseiam em marcadores genéticos selecionados que codificam proteínas com funções diferentes, tais como: proteínas de resposta de fase aguda, do estresse inflamatório oxidativo, processos metabólicos, a regulação do ciclo celular/apoptose e enzimas que estão envolvidas e processos de desintoxicação. Genótipos específicos mostraram relação com diferenças aos danos no DNA; estas surgem a partir das interações gene-ambiente em trabalhadores expostos ao OF (SINGH *et al.*, 2011). Doenças resultantes de situação ocupacional foram listadas na Pesquisa Nacional Ocupacional, lista mestra da agenda de prioridades de pesquisa, como as principais doenças e lesões ocupacionais (KESHAVA e ONG, 1999).

A Paraoxanase-1 (PON1), juntamente com a PON2 e a PON3, compõe a família das Paraoxanases. As três Paraoxanases são produzidas no fígado e os genes que codificam estas enzimas se localizam no cromossomo 7, mais especificamente no seu braço longo (MACKNESS, 2015).

Apesar de possuírem estrutura e função semelhantes, visto que compõem a mesma família de enzimas, elas diferem quanto ao substrato nos

quais atuam e nos locais onde podem ser encontradas. A PON2 é encontrada apenas nos tecidos, caracterizando-se como uma enzima intracelular estrita, enquanto a PON1 e a PON3 são encontradas predominantemente no plasma, associadas ao HDL. Quanto ao substrato em que atuam, a PON1 tem afinidade pelos Organofosforados e algumas medicações, enquanto a PON2 e a PON3 tem afinidades para lactonas. As três enzimas possuem caráter antioxidante, sendo a mais potente delas a PON3 (FURLONG *et al.*, 2016; KULKA, 2016).

A PON1 merece destaque no contexto das intoxicações por Organofosforado porque, uma vez que esta enzima atua na metabolização dos OF aos quais o indivíduo foi exposto, estas substâncias não se ligarão às enzimas envolvidas no processo sináptico, no caso, as colinesterases, e elas poderão concluir suas funções perante a acetilcolina residual de forma eficaz, preservando a fenda sináptica (AKGUR *et al.*, 2003).

Paralelo a este evento, a PON1 também está correlacionada com o estresse oxidativo, atuando juntamente com o colesterol de alta densidade (HDL), acoplando-se a esta molécula e reduzindo as taxas de produção de radicais livres pelo organismo, inclusive durante a metabolização dos OFs. Sabe-se que nas lipoproteínas de baixa densidade, como o LDL (Low Density Lipoprotein) e o VLDL (Very Low Density Lipoprotein), encontramos menos de 5% de atividade da PON1. Ademais, que o HDL possui uma estrutura chamada Apolipoproteína A-I que é responsável pela afinidade com a PON1, além de conferir a estabilidade que a enzima precisa para exercer suas funções (KULKA, 2016). Além disso, pode prevenir o acúmulo de lipídeos na Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e se relaciona com a Doença da Artéria Carótida, onde pacientes que apresentam essa patologia possuem níveis reduzidos desta enzima (FURLONG, 2016).

Ainda sobre a PON1, esta enzima possui propriedades durante o processo inflamatório, atuando como proteína negativa de fase aguda. Com isso, observa-se que os níveis de PON1 tendem a estar mais baixos em pacientes com processos inflamatórios, situação inversamente proporcional à que acontece com a Proteína C reativa, que é um marcador positivo de inflamação (KULKA, 2016).

2. OBJETIVOS

- Analisar o polimorfismo genético rs84560 (gene PON1) em trabalhadores rurais do município de Lagarto, Salgado e Boquim-SE.
- Genotipar as amostras, utilizando *primers* e sondas específicos para o SNP pesquisado, através de PCR *Real Time*.

3. METODOLOGIA

A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência dos SNPs é o PCR em tempo real. A primeira etapa consiste na extração do DNA, em que ocorre lise das membranas biológicas e purificação do material genético; é realizada pela técnica de micropartículas magnéticas, através de automação, com o equipamento m2000 sp da ABBOTT®. Nesse tipo de extração, após a solução de lise ser adicionada à amostra, o DNA é liberado do envoltório nuclear e se liga às partículas magnéticas, que possuem afinidade pelo mesmo. Um sistema de ímã prende as partículas, de forma que as lavagens que o aparelho realiza na solução retirem todas as outras estruturas presentes na célula lizada, purificando a amostra de qualquer contaminante ou interferente. Em seguida, uma substância eluente quebra a ligação entre o DNA e as partículas magnéticas; o material genético, então, está purificado e pronto para a segunda etapa.

Uma vez extraído e purificado, a próxima etapa será a genotipagem das amostras, utilizando *primers* e sondas específicos para os SNPs pesquisados. Os desenhos dos *primers* foram previamente desenvolvidos pela empresa Thermo Scientific®, e adquiridos juntamente com as respectivas sondas, também

previamente padronizadas. Os primers marcam a região de interesse que se deseja pesquisar no DNA estudado, possuindo uma sequência iniciadora para a direção 5' – 3' para o primer Forward e outra para o primer Reverse, na direção 3-5', já que as fitas têm de possuir nucleotídeos que sejam complementares. Uma vez reconhecendo a região complementar no DNA presente na amostra, o primer se liga à mesma e a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação do material genético, inicia o procedimento de duplicação das fitas.

O fundamento da técnica de PCR em tempo real consiste justamente em simular *in vitro* a replicação do DNA que ocorre *in vivo*, com oscilações de temperatura que promovem a desnaturação da fita dupla de DNA ($\pm 95^{\circ}\text{C}$), formando duas fitas simples, o anelamento dessas fitas com os primers e a posterior extensão ($\pm 60^{\circ}\text{C}$), onde uma fita gerará duas outras fitas e, a cada ciclo, essa replicação ganha um caráter logarítmico. Ao final de 40 ciclos, teremos milhares de cópias de DNA. A cada replicação, um sinal fluorescente é liberado pela sonda, que está acoplada ao primer, e esse sinal é captado pelo equipamento e transformado em informação clínica, que, no caso deste estudo, é representada pela presença dos genótipos estudados. O equipamento utilizado é o Viia 7 da Thermo Scientific®.

Após a identificação das variantes genéticas, estas são comparadas com os quantitativos séricos obtidos no exame bioquímico da BChE. Isto para cada sujeito da pesquisa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram genotipados 413 trabalhadores rurais do município de Lagarto, Salgado e Boquim- SE. O polimorfismo no gene da PON1(rs854560) apresentou-

se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados da genotipagem dos trabalhadores rurais foram representados em valores percentuais de frequência dos genótipos.

Para o rs854560, temos que o alelo A foi o mais frequente, sendo que os resultados mostraram maior frequência de indivíduos portadores do alelo selvagem em homozigose (47,7%), seguido do genótipo heterozigoto (41,6%).

As frequências alélicas da amostra estão representadas na Tabela 01, sendo que para esse polimorfismo não foram encontrados estudos com a população Yorubá, população escolhida como referência pelo perfil de ancestralidade dos trabalhadores rurais deste estudo. (LIMA-COSTA *et al.*, 2015; PENA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2016; SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2012).

Tabela 01. Distribuição das frequências alélicas da amostra e da população Yorubá.

TagSNP	Alelos	Frequência alélica
rs854560	T	0,7
	A	0,3

A frequência de distribuição entre os genótipos, utilizando o modelo aditivo-dominante-recessivo está descrita pela Tabela 02.

Tabela 02. Frequência de distribuição entre os genótipos no modelo aditivo-dominante-recessivo

TagSNP	Alelo associado	Modelo genético	Alelos	N (%)
rs854560	C	Aditivo	AA	197 (47,7)
			AT	172 (41,6)
			TT	44 (10,7)
rs854560	C	Dominante	AA	197 (47,7)
			AT + TT	216 (52,3)
rs854560	C	Recessivo	AA + AT	369 (89,3)
			TT	44 (10,7)

A atividade de BChE também foi relacionada com os genótipos. Porém, não houve diferença estatística entre este parâmetro e o polimorfismo rs854560, como apresentado na Tabela 03.

Tabela 03. Associação entre os genótipos no modelo aditivo-dominante-recessivo e a atividade da BChE

TagSNP	Alelo associado	Modelo genético	Alelos	BChE normal	BChE reduzida	Valor de P
rs854560	C	Aditivo	AA	161 (49,8)	7 (50)	0,912 **
			AT	128 (39,6)	6 (42,9)	
			TT	34 (10,5)	1 (7,1)	
rs854560	C	Dominante	AA	161 (49,8)	7 (50)	0,991*
			AT + TT	162 (50,2)	7 (50)	
rs854560	C	Recessivo	AA + AT	289 (89,5)	13 (92,9)	1,000*
			TT	39 (10,5)	1 (7,1)	

*Teste Exato de Fisher

** Modelo de Regressão Logística Binária

O alelo A foi o mais frequente, apresentando a ordem de frequência genotípica de AA>AT>TT. Frequência semelhante foi encontrada em uma população de chineses, apesar do adverso perfil de ancestralidade entre as populações (ZHANG *et al.*, 2014). Os dois estudos, ao correlacionar este SNP com exposição a OF e, conseqüentemente, à manifestação de sintomas, não encontraram relação significativa. Outro trabalho desenvolvido na Espanha, com trabalhadores rurais (n= 102), mostrou a associação entre sintomas e genótipos. Porém, não foi encontrada associação significativa entre as variáveis (p = 0,989) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

5. CONCLUSÕES

Para o rs854560, o alelo A foi o mais frequente, sendo que os resultados mostraram maior frequência de indivíduos portadores do alelo selvagem em homozigose (47,7%), seguido do genótipo heterozigoto (41,6%).

6. PERSPECTIVAS

O estudo do polimorfismo rs854560 pode permitir a identificação de fatores genéticos que tornam determinadas populações mais propensas a manifestar sintomas perante exposição a OF, com aplicação especial a grupos rurais que já são muito atingidos por fatores extrínsecos de intoxicação.

Dessa maneira, esse SNP é uma variante que merece mais estudos, assim como outros SNPs que podem estar envolvidos.

7. OUTRAS ATIVIDADES

Os dados coletados na estação de anamnese em formulários eletrônicos foram migrados eletronicamente para planilhas do tipo Microsoft® excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx). Para migração dos dados coletados na estação de coleta de sangue, posteriormente à coleta os valores obtidos foram tabulados em planilha do tipo Microsoft® Excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx) utilizando dupla digitação e posterior “data compare”, desta forma checando a consistência da migração.

Este trabalho foi dividido entre as análises descritivas, análise de variáveis contínuas e categóricas, na qual foram analisadas as características sociodemográficas e econômicas (faixa etária, gênero, cor da pele, local de residência, grau de instrução e classe socioeconômica - segundo o Critério de

Classificação Econômica Brasil – CCEB, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – ABEP - APÊNDICE C) e feita a genotipagem dos trabalhadores rurais para o SNP estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA L.M.; PAULILLO L. F. **A relevância da citricultura na demanda de trabalho agrícola no Estado de São Paulo**. In: _____ PAULILLO et al. (Coord.). Agroindústria no Brasil: diferenças e dominância. Rio de Janeiro: Papers, 2006. cap.5, p.180.

ALLDERDICE, P.W.; GARNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N., MCALPINES, J. **The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26**. Genomics, San Diego, v.11, n.2, p.452-454, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2006. **Sistema de informações sobre agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13 dez/2011.

ANDREOLI, C. V. et al. **Avaliação dos níveis de agrotóxicos encontrados na água de abastecimento nas regiões de Curitiba e Londrina**. Revista Técnica da Sanepar: SANARE, 2000. v.12, n. 12.

BARBOSA, L. C. **Pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 57- 106.

BRASIL, 1997. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Brasília).

BRASIL, 1989. **Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989**. Diário Oficial da União, Brasília, p. 15-53, 11 jul. 1989. Seção I.

BROOMFIELD, C.A.; MAXWELL, D.M.; SOLANA, R.P.; CASTRO, C.A.; FINGER, AV; LENZ, DE. **Protection by butyrylcholinesterase against**

organophosphorus poisoning in nonhuman primates. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Baltimore, v.259, n.2, p.633-638, 1991.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. **Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase.** The Biochemical Journal, Londres, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

CHIA SE, MOHAMED ALI S, YAP PH, GAN L, ONG YB, CHIA KS. **Distribution of PON1 polymorphisms PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate exposure.** Neurotoxicology. 2009 Mar;30(2):214-9. Epub 2008 Dec 24.

COKUGRAS, A.N. **Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance.** Turkish Journal of Biochemistry, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. **Neurobiology of butyrylcholinesterase.** Nature Reviews. Neuroscience, Londres, v.4, n.2, p.131-138, 2003.

DOMINGUES. M. R. et al. **Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural.** Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. Londrina, v. 25, p. 45-54, dez. 2004.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. **Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission.** Toxicology, Amsterdã, v.233, n.1-3, p.60-69, 2007.

DYMINSKI A. S. **Contaminação de solos e águas subterrâneas.** Universidade Federal do Paraná. Aula Técnica 019. Dezembro de 2006. Disponível

em:http://www.cesec.ufpr.br/docente/andrea/TC019_Contaminacao_de_solos.pdf.

Acesso em: 13 dez/2011.

FABIAN G., FARAGO N., FEHER L.Z., NAGY L.I., KULIN S., KITAJKA K., BITO T., TUBAK V., KATONA R.L., TISZLAVICZ L., PUSKAS L.G. **High-Density Real-Time PCR-Based in Vivo Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity**. Int J Mol Sci. 2011;12(9):6116-34. Epub 2011 Sep 19.

GIRARD, E; BERNARD, V.; MINIC, J.; CHATONNET, A.; KREJCI, E.; MOLGÓ J. **Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice**. Life Sciences, Oxford, v.80, n.24-25, p.2380–2385, 2007.

GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE JR., C.W. **Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey**. Nature, Londres, v.299, n.5882, p.439-442, 1982.

HERNÁNDEZ A.F., MACKNESS B., RODRIGO L., LÓPEZ O., PLA A., GIL F.I. **Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure**. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2003; 22(11):565–74. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327103ht400oa>

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Agrícola**. Setembro de 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201109.pdf Acesso em: 13 dez/2011.

JBILLO, O.; BARTELS, C.F.; CHATONNET, A.; TOUTANT, J.P.; LOCKRIDGE, O. **Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA**. Toxicon, Nova Iorque, v.32, n.11, p.1445-1457, 1994.

KESHAHA N., ONG T.M. **Occupational exposure to genotoxic agents**. Mutat Res. 1999 Sep;437(2):175-94.

LEE, L.G., CONNELL, C.R. and W. Bloch. **Allelic Discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes**. Nucleic Acids .1993. Res. 21: 3761-3766.

LI, B.; STRIBLEY, J.A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L.M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. **Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse**. Journal of Neurochemistry, Londres, v.75, p.1320-1331, 2000.

LIMA-COSTA M.F., RODRIGUES L.C., BARRETO M.L., GOUVEIA M., HORTA B.L., MAMBRINI J. **Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative)**. Sci Rep [Internet]. 2015; 5(1): 9812. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep09812>

LOPES, T. M. N. **Avaliação de pesticidas em água utilizada para o consumo humano no município de Dourados (MS)**. 2006. 161 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine**. Neuroscience, Oxford, v.110, n.4, p.627-639, 2002.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. **A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase**. Biochemical and Biophysical Research Communications, Nova Iorque, v.189, n.3, p.1280-1286, 1992.

NEVES E. M.; DAYOUB M.; DRAGONE D. S. **Análise da demanda por defensivos agrícolas pela fruticultura brasileira 1997 – 2000**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 24, n. 3, dez. 2002.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase- important enzymes of human body**. Acta Medica, Hradec Králové, v.47, n.4, p.215-228, 2004.

PENA S.D.J, DI PIETRO G., FUCHSHUBER-MORAES M., GENRO J.P., HUTZ M.H., KEHDY F. DE S.G. **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected**. PLoS One. 2011; 6(2).

QUINN D. M. **Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states**. Chemical Reviews, Washington, v.87, p.955-979, 1987.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4^aed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.110, 2001.

ROSE R.L., TANG J., CHOI J., CAO Y., USMANI A., CHERRINGTON N., HODGSON E. **Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms**. Scand J Work Environ Health. 2005;31Suppl 1:156-63; discussion 119-22.

SANTOS H.C., HORIMOTO A.V.R., TARAZONA-SANTOS E., RODRIGUES-SOARES F., BARRETO M.L., HORTA B.L. **A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set**. Eur J Hum Genet [Internet]. 2016; 24(5): 725–31. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ejhg.2015.187>

SCHWARZ, M.; GLICK, D.; LOEWENSTEIN, Y.; SOREQ, H. **Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons**. Pharmacology and Therapeutics, Oxford, v.67, n.2, p.283-322, 1995.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. **Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease**. Neurochemistry International, Oxford, v.28, n.5-6, p.453-483, 1996.

SANCHES S.M. et al. **Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água.** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p.53-58, jan./dez. 2003.

SCATENA L. M. ; DUARTE R. G. **Como o produtor rural usa agrotóxicos.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n. 2, p.191 – 194, 2006.

SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2006. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/>. Acesso em: 13/dez/2011.

SINGH S., KUMAR V., SINGH P., THAKUR S., BANERJEE B.D., RAUTELA R.S., GROVER S.S., RAWAT D.S., PASHA S.T., JAIN S.K., RAI A. **Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides.** Mutat Res. 2011 Oct9;725(1-2):36-42. Epub 2011 Jun 28.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. **Acetylcholinesterase-new roles for an old actor.** Nature Reviews. Neuroscience, Londres, v.2, n.4, p.294-302, 2001.

SOUZA. A. Singularidades do mercado frutas cítricas. Toda Fruta, 2005. Disponível em <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=9073>. Acesso em: 13/dez/2011.

STOPELLI, I.; M .A. **Agricultura, ambiente saúde e: uma abordagem sobre o risco de contato com os agrotóxicos a partir de um registro hospitalar de referência regional.** (Tese Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, 2005.

SUAREZ-KURTZ G., PENA S.D.J., STRUCHINER C.J., HUTZ M.H. **Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin.** Front Pharmacol. 2012; 3 NOV(November): 1–7.

VIEIRA A. C. **Aspectos técnicos da produção citrícola no Brasil**. In: PAULILLO et al.(Coord.). Agroindústria no Brasil: diferenças e dominância. Rio de Janeiro: Papers,2006. cap 7, p. 295.

YUCESoy B., JOHNSON V.J. **Genetic variability in susceptibility to occupational respiratory sensitization**. J Allergy (Cairo). 2011; 2011:346719. Epub 2011 Jun 12.

ZHANG X., SUI H., LI H., ZHENG J., WANG F., LI B. **Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in northern Han Chinese workers exposed to organophosphate pesticides**. Exp Biol Med [Internet]. 2014; 239(2):232–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213513983>